

Appl. No. 10/655217

Use of enzymatically active proteins, specific for cell wall lysis of Listeria

Patent Number: DE4326617

Publication date: 1994-06-30

Inventor(s): SCHERER SIEGFRIED (DE)

Applicant(s): SCHERER SIEGFRIED UNIV PROF DR (DE)

Requested Patent: DE4326617

Application Number: DE19934326617 19930807

Priority Number(s): DE19934326617 19930807

IPC Classification: A23L3/3463; A23C19/097

EC Classification: A23C19/10, A23L3/3571, A23C19/05H

Equivalents:

Abstract

Enzymatically active proteins, causing cell wall lysis, formed by bacteriophages of the genus Listeria during expression of late genes (phagolysine) are used for the selective control/decontamination of pathogenic bacteria of genus KListeria (Listeria monocytogenes) in and on food during prepn. and storage. The phagolysine compsn. contg. one or more phagolysines, is applied during or after the prodn. or in the food prodn. plant.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2



⑧ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑧ **Patentschrift**
⑩ **DE 43 26 617 C 1**

⑥ Int. Cl. 5:
A 23 L 3/3463
A 23 C 19/097

DE 43 26 617 C 1

⑪ Aktenzeichen: P 43 26 617.7-41
⑫ Anmeldetag: 7. 8. 93
⑬ Offenlegungstag: —
⑭ Veröffentlichungstag der Patentarbeitung: 30. 6. 94

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑮ Patentinhaber:

Scherer, Siegfried, Univ.-Prof. Dr., 85356 Freising,
DE

⑯ Erfinder:

gleich Patentinhaber

⑰ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

Applied and Environmental Microbiology, Vol. 55,
No. 3, S. 631-638, 1989;

⑲ Verfahren zur selektiven Bekämpfung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln durch Phagolysine aus Listeriaphagen

⑳ Alle nicht abschließend keimtötend behandelten Lebensmittel können potentiell mit pathogenen *Listeria* kontaminiert sein. Eine gezielte natürliche biologische Bekämpfung war bisher nicht möglich, da durch Zusatz von verfügbaren lytischen Enzymen auch andere Organismen (Reifungsflora) geschädigt werden. Das neue Verfahren erlaubt eine spezifische Bekämpfung von *Listeria* ohne Beeinträchtigung anderer Bakterien.

Es werden Präparate von lytischen Enzymen (Phagolysine) verwendet, welche von Bakteriophagen der Gattung *Listeria* (unter anderem Listeriophage A511) während der späten Genexpression gebildet werden, um die Wirtszellen zu lysieren. Das hochaktive Protein ist *Listeria*-spezifisch zellwandlytisch wirksam und hat keine Fremdaktivität gegenüber anderen eukaryonten oder prokaryonten Organismen. Es ist deshalb insbesondere gesundheitlich unabdenklich. Es wird entweder aus viralen Lysaten oder aus rekombinanten Produzenten gewonnen, aufgereinigt und kann dem Lebensmittel zugesetzt werden.

Das beschriebene Verfahren eignet sich zur selektiven Bekämpfung/Dekontamination des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* in und auf Lebensmitteln oder in Lebensmittelproduktionsanlagen. Eine solche selektive Bekämpfung war bisher nicht möglich.

DE 43 26 617 C 1

Beschreibung

1. Bezeichnung der Erfindung

Verfahren zur selektiven Bekämpfung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln durch Phagolysine aus Listeriaphagen

2. Gebiet der Erfindung

10

Ein bekanntes Problem der Lebensmittelhygiene ist der Befall verschiedenster Lebensmittel mit dem humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes*. Wenn immungeschwächte Personen (Kranke oder alte Personen, schwangere Frauen) infiziert werden, können ernsthafte Erkrankungen mit Todesfolge resultieren.

3. Stand der Technik

Als Gegenmaßnahme wurde vorgeschlagen, dem Lebensmittel Lysozym aus Hühnereiklar (Zeitschrift "Applied and Environmental Microbiology", Jahrgang 55, 1989, Seiten 631 – 638) oder von anderen Bakterien gebildete Bakteriozine (Zeitschrift "Applied and Environmental Microbiology", Jahrgang 54, 1988, Seiten 2349 – 2353) zur Bekämpfung oder Inhibition von *Listeria* in Lebensmitteln zu verwenden. Alle bisher vorgeschlagenen Verfahren sind jedoch fehlgeschlagen, weil die Zusatzstoffe biologischer oder chemischer Natur den Nachteil aufweisen, daß nicht nur *Listeria*, sondern auch viele oder sogar alle anderen Bakterien in den behandelten Produkten geschädigt oder getötet werden. Dies ist besonders nachteilig bei mit Starterkulturen hergestellten Lebensmitteln wie Käse oder Dauerfleischwaren; gerade diese sind aber besonders *Listeria*-gefährdet. Das im folgenden beschriebene Verfahren weist diese Nachteile nicht auf.

4. Beschreibung der Erfindung

Insgesamt wurden zahlreiche Listeriaphagen beschrieben, darunter zahlreiche eigene Isolate, insbesondere der einzige virulente Listeriophage A511 mit außerordentlich weitem Wirtsbereich aus meinem Labor. Listeriaphagen injizieren ihre DNA in *Listeria*-Wirtszellen. Um nach Abschluß der Infektion die in der Wirtszelle neu gebildeten Listeriaphagen freizusetzen, wird als finales Genprodukt während der Expression der späten Phagengene ein zellwandlytisches Enzym (Phagolysin) gebildet. Die Phagolysine von Listeriaphagen sind spezifisch aktiv gegen Zellwände von Bakterien der Gattung *Listeria*, wie in entsprechenden Versuchen nachgewiesen wurde. Auch die externe Zugabe gereinigter Lysozyme in geringsten Konzentrationen zu *Listeria* führt zu deren Lyse und damit zum Zelltod (bakterizide Wirkung). Die diesen Experimenten zugrundeliegende Präparation und Charakterisierung von Phagolysin aus Listeriaphagen sowie die begonnene Charakterisierung der zugehörenden Listeriaphagengenome wurde noch nirgendwo publiziert.

Durch die Zugabe, Beimischung, Oberflächenbehandlung zu, in und von Lebensmitteln sowie in Lebensmittelproduktionsanlagen mittels der spezifisch wirksamen Phagolysine läßt sich eine selektive Eliminierung von *Listeria* erreichen, ohne andere (erwünschte) Organismen zu beeinträchtigen. Des Weiteren kann eine andere Wirkung/Aktivität der Lysine in irgendeiner Weise aus-

geschlossen werden. Damit sind Phagolysine als Lebensmittelzusatzstoffe qualifiziert. Das Phagolysin kann in einer standardisierten Form in die Rohstoffe gefährdeter Lebensmittel eingebracht, vor oder während gegebener Produktionsschritte dem Lebensmittel oder der Anlage zugesetzt, dem fertigen Endprodukt beigemischt oder aufgetragen werden, um eine Kontamination der abgegebenen Lebensmittel mit humanpathogenen *Listeria* zu bekämpfen.

5. Herstellung der Phagolysinpräparate

Die biochemische Isolation wurde bis zur Reinheit durchgeführt und das Phagolysin in o. Weise getestet. Aus mit Listeriaphagen infizierten *Listeria*-zellen läßt sich mit dem getesteten Verfahren Phagolysin gewinnen. Ebenfalls kann mit diesen Verfahren Phagolysin aus rekombinanten, das Phagolysin-Gen enthaltenden *Escherichia coli*-Stämmen präpariert werden. Dazu werden die phagolysin-codierenden Gene aus den Genomen der Listeriaphagen isoliert und in Expressionsvektoren in dem Bakterium *Escherichia coli* subkloniert. Die Synthese von Proteinen mittels solcher Expressionsvektoren kann in hoher Ausbeute in *E. coli* durchgeführt werden.

6. Gewerbliche Nutzung

Produktion und Verkauf von Phagolysin-Präparaten an Lebensmittelhersteller. Bisher gibt es keine Alternative zu diesem Verfahren zur selektiven Bekämpfung von *Listeria* in Lebensmitteln.

7. Ausführungsbeispiel

Zur Herstellung von Weichkäsen des Typs "Rotschmierkäse", welcher oft mit *Listeria* kontaminiert ist, wird Kesselmilch zur Milchsäurebildung und Dickung mit Säuerungskulturen versetzt. Durch die schon hier erfolgende Zugabe von Phagolysinen können die schon in der Milch oder der Starterkultur vorhandenen *Listeria* entfernt werden. Im weiteren Verlauf der Käseherstellung wird wiederholt eine Oberflächen-Rotschmierkultur auf die Käse aufgebracht, welche mit *Listeria* kontaminiert sein kann. Eine gleichzeitige Applikation der Phagolysine zu diesem Zeitpunkt unterbindet wirkungsvoll die Entwicklung der pathogenen Organismen. Häufig erfolgen die Kontaminationen auch durch mangelhafte Lagerungs- und Reifungsbedingungen, wobei *Listeria* auf die Käse gelangen. Das Vorhandensein von Phagolysinen auf den Käseoberflächen würde diesen Rekontaminationen jedoch entgegenwirken. Da die Enzyme ein sehr spezifisches, ausschließlich gegen *Listeria* gerichtetes Aktivitätsspektrum aufweisen und keine Fremdaktivitäten haben, ist die Entwicklung der gewünschten Rotschmierflora nicht gehindert. Die Aufnahme der Phagolysine durch den Verzehr der Käse ist deshalb ebenfalls völlig unbedenklich.

Patentanspruch

Verwendung von zellwandlytischen, enzymatisch aktiven Proteinen, welche durch Bakteriophagen der Gattung *Listeria* während der Expression der späten Gen gebildet werden (Phagolysin), zur selektiven Bekämpfung/Dekontamination von pathogenen Bakterien der Gattung *Listeria* (*Listeria monocytogenes*) in und auf Lebensmitteln, während

deren Herstellung und Lagerung, wobei die Phago-
lysinpräparationen, welche ein oder mehrere Pha-
golysine enthalten können, dem Lebensmittel wäh-
rend oder nach der Herstellung zugesetzt oder in
die Lebensmittelproduktionsanlage eingebracht
werden. 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65